

(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 189 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/52, C12N 15/54,
C12N 15/60, C12N 15/77,
C12P 13/02

(21) Anmeldenummer: 99123738.9

// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)

(22) Anmeldetag: 30.11.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

• FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH
52428 Jülich (DE)

Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(72) Erfinder:
• Eggeling, Lothar, Dr.
52428 Jülich (DE)
• Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)
• Sahm, Herrmann, Prof.Dr.
52428 Jülich (DE)

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855312

(71) Anmelder:

• Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung coryneformer Bakterien

(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft Corynebacterium, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

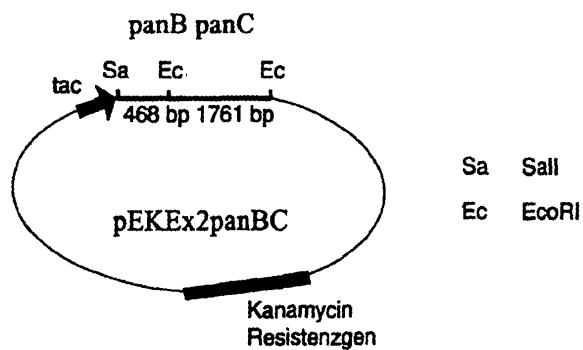
thetas), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsyn-

thetas), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

Abbildung 2



EP 1 006 189 A2

Beschreibung

Stand der Technik

5 [0001] Die Pantothenäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.

[0002] Pantothenäure kann durch chemische Synthese oder biotechnologisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Der Vorteil der biotechnologischen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der Bildung der gewünschten stereo-isomeren D-Form der Pantothenäure.

10 [0003] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaromyces castellii* können, wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothenäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothenäure-Biosynthesegegenen mittels der Plasmide pFV3 und pFV5 die Bildung von D-Pantothenäure verbessert wird.

15 [0004] EP-A 0 590 857 betrifft Stämme von *Escherichia coli*, die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite, wie z. B. Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure etc. tragen und in einer Nährösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantoinsäure und D-Pantothenäure produzieren. In EP-A 0 590 857 wird weiterhin beschrieben, daß durch Amplifikation von nicht näher definierten Pantothenäure-Biosynthesegegenen aus *E. coli*, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, die Produktion von D-Pantoinsäure und D-Pantothenäure in *E. coli* verbessert werden kann.

20 [0005] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothenäure bildenden Mutanten von *Escherichia coli* durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die Pantothenäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

Aufgabe der Erfindung

25 [0006] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäure mit Hilfe coryneformer Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

30 [0007] Das Vitamin Pantothenäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interess daran verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure bereitzustellen.

Wenn im folgenden Text D-Pantothenäure oder Pantothenäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freie Säure, sondern auch die Salze der D-Pantothenäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

Gegenstand der Erfindung sind in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

40 a) codierend für das *panB*-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
b) codierend für das *panC*-Gen (Pantothenatsynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das *panBC*-Operon und gegebenenfalls
c) codierend für das *ilvD*-Gen (Dihydroxsäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.

45 [0008] Gegenstand der Erfindung sind ebenso replizierbare DNA gemäß dem genannten Anspruch 1 mit:

50 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
(ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
(iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls
(iii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

55 [0009] Ebenso werden beansprucht coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer replizierbarer DNA-Stücke.
Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothenäure unter Verwendung, insbesond-

ere diese Säure bereits produzierender coryneformer Bakterien, in denen die Gene *panB* und *panC* einzeln oder kombiniert miteinander gegebenenfalls kombiniert mit einer Defektmutation im *ilvA*-Gen oder einer Verstärkung der Gene *ilvBN*, *ilvC* oder *ilvD* verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0010] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man z. B. die Kopienzahl des(der) Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0011] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantotheninsäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen, insbesondere aus Glucose oder Saccharose. Es handelt sich um coryneforme Bakterien z. B. der Gattungen *Corynebacterium* oder *Arthrobacter*. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist Aminosäuren zu bilden. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 und davon abgeleitete Stämme.

[0012] Die Erfinder fanden heraus, dass nach Verstärkung, insbesondere Überexpression, der neu isolierten D-Pantothenatbiosynthesegene *panB* und *panC* einzeln oder gemeinsam (*panBC*-Operon) aus *Corynebacterium glutamicum*, die für die Enzyme Ketopantoathydroxymethyltransferase und Pantothenatesynthetase kodieren, in verbesserter Weise D-Pantothenat produziert wird.

[0013] Die Erfinder haben weiter festgestellt, daß eine verstärkte Expression des neuen Valinbiosynthesegens *ilvD* aus *Corynebacterium glutamicum*, welches für das Enzym Dihydroxysäuredehydratase kodiert, zur erhöhten D-Pantothenatbildung beiträgt. Erfindungsgemäß bewirken neben diesem Gen auch die verstärkte Expression der *ilvBN*-Gene, die für das Enzym Acetohydroxysäuresynthetase kodieren, und des *ilvC*-Gens, das für das Enzym Isomeroreduktase kodiert, in *Corynebacterium glutamicum* eine erhöhte D-Pantothenatbildung.

[0014] Zur Erzielung einer Verstärkung (Überexpression) erhöht man z. B. die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmidvektoren mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0015] Zur Isolierung der Gene *panB* und *panC* aus *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ-Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC19 (Norrrander et al., 1983, Gene, 26: 101-106) verwendet werden. Als Wirs eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5αmr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde.

[0016] Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Die Indikatorstämme bzw. Mutanten sind aus publizierten Quellen oder Stammsammlungen erhältlich oder werden gegebenenfalls selbst hergestellt. Im Rahmen

der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV39 (Vallari und Rock, *Journal of Bacteriology* 1985, 164:136-142), die eine Mutation im panC-Gen trägt, von besonderem Interesse. Ein anderes Beispiel für eine Pantothenäure-bedürftige *E. coli* Mutante ist der Stamm SJ2, der eine Mutation im panB-Gen trägt und vom Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) bezogen werden kann. Ein weiteres Beispiel ist die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte *C. glutamicum* Mutante R1277, die in dem für die Dihydroxsäuredehydratase kodierendem ilvD-Gen defekt ist. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der panB-Mutante SJ2 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen wie z.B. das panB-Gen trägt, und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantothenäure-Bedürftigkeit prototroph.

[0017] Das dargestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (*Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA*, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden.

[0018] Auf diese Weise wurde die neue für die Gene panB und panC kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panB-Genproduktes nämlich der Ketopantoathydroxymethyltransferase und in SEQ ID NO 3 die sich ergebende Aminosäuresequenz des panC-Genproduktes nämlich der Pantothenatsynthetase dargestellt. Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für das ilvD-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 4 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ ID NO 5 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des ilvD-Genproduktes nämlich der Dihydroxsäuredehydratase dargestellt.

[0019] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 durch einen degenerierten genetischen Code ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (*Journal of Bacteriology* 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (*Gene* 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (*Protein Sciences* 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (*Bio/Technology* 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 und/oder SEQ ID NO 5 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

[0020] Das dargestalt charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzexprimieren besteht darin diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionssignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *Corynebacterium glutamicum* kommen z.B. die Vektoren pEKEx1 (Eikmanns et al., *Gene* 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) oder pEKEx2 (Eikmanns et al. *Microbiology* 140: 1817-1828 (1994) oder pECM2 (Jäger et al. *Journal of Bacteriology* 174(16): 5462-5465 (1992)) in Frage. Beispiele für derartige Plasmide sind pEKEx2panBC und pECM3ilvBNCD, die in den Stämmen DH5αmcr/pEKEx2panBC und DH5αmcr/pECM3ilvBNCD enthalten sind. Plasmid pEKEx2panBC ist ein *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor der die Gene panB und panC trägt. Plasmid pECM3ilvBNCD ist ein *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor der neben dem ilvD-Gen weiterhin die Gene ilvBN und ilvC trägt.

[0021] Die Erfinder haben weiterhin gefunden, dass sich die Verstärkung der Gene panB und panC einzeln, gemeinsam oder in Kombination mit den Genen ilvBN, ilvC und ilvD in solchen Mikroorganismen vorteilhaft auswirkt, die eine reduzierte Synthese der Aminosäuren Threonin und Isoleucin aufweisen. Diese reduzierte Synthese kann durch Abschwächung oder Ausschaltung der entsprechenden Biosynthetiseenzyme bzw. ihrer Aktivitäten erreicht werden. Hierfür kommen zum Beispiel die Enzyme Homoserindehydrogenase, Homoserinkinase, Threoninsynthase oder auch Threonindehydratase in Frage. Eine Möglichkeit Enzyme und deren Aktivitäten abzuschwächen oder auszuschalten sind Mutageneseverfahren.

[0022] Hierzu gehören ungerichtete Verfahren, die chemische Reagenzien wie z.B. N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin oder auch UV-Bestrahlung zur Mutagenese benutzen, mit anschließender Suche der gewünschten Mikroorganismen auf Bedürftigkeit für L-Threonin oder L-Isoleucin. Verfahren zur Mutationsauslösung und Mutantensuche sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (*A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

[0023] Weiterhin gehören hierzu gerichtete rekombinante DNA-Techniken. Mit Hilfe dieser Methoden kann zum Beispiel das für die Threonindehydrolase kodierende *ilvA*-Gen im Chromosom deletiert werden. Geeignete Methoden dazu sind bei Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of Bacteriology (1998) 179: 6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile des Gens deletiert werden, oder auch mutierte Fragmente des Threonindehydrolasegens ausgetauscht werden. Durch Deletion oder Austausch wird so ein Verlust oder eine Reduktion der Threonindehydrolaseaktivität erreicht (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842; Morbach et al., (1996) Applied Microbiology and Biotechnology 45: 612-620). Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der *C. glutamicum* Stamm ATCC13032Δ*ilvA*, der eine Deletion im *ilvA*-Gen trägt.

[0024] Die erfundungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantotheninsäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0025] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantotheninsäure-Produktion Vorstufen der Pantotheninsäure wie z. B. Aspartat, β-Alanin; Ketolsovalerat, Ketopantoat, Pantoat und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0026] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantotheninsäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0027] Die Konzentration an gebildeter Pantotheninsäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden. Zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantotheninsäure wird gebräuchlicherweise der Stamm *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 eingesetzt (U.S. Pharmacopeia 1980; AOAC International 1980). Darüberhinaus werden auch andere Testorganismen, wie z.B. *Pediococcus acidilactici* NCIB6990 zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantothensäurekonzentrationen eingesetzt (Sollberg and Hegna; Methods in Enzymology 62, 201-204 (1979)).

[0028] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- 50 • *Escherichia coli* K12 Stamm DH5αmcr/pEKEx2panBC als DSM12456
- *Escherichia coli* K12 Stamm DH5αmcr/pECM3ivBNCD als DSM12457
- *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032Δ*ilvA* als DSM12455

Beispiele

55 [0029] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Klonierung, Sequenzierung und Expression der Gene der Pantothenatbiosynthese panB und panC aus C. glutamicum

5 1. Klonierung des panB- und des panC-Gens

[0030] Chromosomal DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach geelektrophoretischer Auf trennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 kb bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und 10 nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580). Inserttragende 15 Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf 10 μ g/ml Tetracyclin enthaltende LB-Agarplatten identifiziert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) von vereinigten Klonen wurden 8 Gruppen, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Gruppen, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb enthielten isoliert. Die *E. coli* panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank 20 mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Bei 8 Plasmiden konnte durch Retransformation die Fähigkeit, den panB-Defekt der *E. coli* Mutante SJ2 heterolog zu 25 komplementieren, bestätigt werden.

[0031] Mit diesen 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Plasmidvektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von 9,3 kb Länge (Abbildung 1). Die Transformation der *E. coli* panC Mutante DV39 (Vallari und Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in der Lage war den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren.

30 2. Sequenzierung des panB- und des panC-Gens

[0032] Ein 2,2 kb großes Fragment des Inserts (Abbildung 1) von pUR1 wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden zunächst mittels Exonuklease III Subkline erzeugt, die mit Hilfe von Standard Primern (Universal und reverse primer der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland) sequenziert wurden. 35 Die geelektrophoretische Analyse der Sequenzieransätze erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm Paket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern. Ein offenes Leseraster von 813 bp Länge, das als panB-Gen identifiziert wurde, kodiert für ein Polypeptid von 271 Aminosäuren und ist 40 als SEQ ID NO 2 wiedergegeben. Das zweite offene Leseraster, das als panC-Gen identifiziert wurde, umfaßt 837 Basenpaare. Es kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren, das als SEQ ID NO 3 wiedergegeben ist.

45 3. Expression des panB- und des panC-Gens

[0033] Die Gene panB und panC wurden in den *C. glutamicum* Expressionsvektor pEKEx2 kloniert (Eikmanns et al. 1994, Microbiology 140: 1817-1828 (1994)), in welchem die beiden Gene unter der Kontrolle des starken, durch IPTG induzierbaren tac-Promotors vorliegen. Die Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde mittels PCR der Anfang des panB Gens amplifiziert. Hierzu wurde mit Hilfe eines entsprechenden Primers 19 bp vor dem Startcodon von panB eine SalI-Schnittstelle eingefügt (Primer 1: 5'GATCGTCGACCATCACATCTATACT-CATGCC 3'). Der zweite Primer wurde so gewählt, daß die panB interne EcoRI Schnittstelle im amplifizierten Fragment enthalten war (Primer 2: 5'ACCCG ATGTGGCCGACAACC 3'). Die PCR wurde mit einer Annealingtemperatur von 62°C und dem Plasmid pUR1 als Matrize nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)) durchgeführt. Das resultierende 468 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen SalI und EcoRI geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pEKEx2 ligiert. Mit dem 55 Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mcr/pEKEx2panB' wurde der Vektor pEKEx2panB' isoliert.

[0034] Aus dem Plasmid pUR1 wurde nun ein 1761 bp großes, die zweite Hälfte des panBC-Clusters enthaltendes, EcoRI Fragment mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten. Dieses wurde in den schon das panB PCR-Produkt enthal-

tenden, zuvor mit EcoRI linearisierten pEKEx2panB' Vektor kloniert. Mit dem entsprechenden Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mcr/pEKEx2panBC wurde der Vektor pEKEx2panBC (Abbildung 2) isoliert, in dem das panBC-Gencluster unter der Kontrolle des tac-Promotors vorliegt.

5 Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung des für die Dihydroxsäuredehydratase kodierenden ilvD-Gens aus *C. glutamicum*

10 1. Isolierung einer ilvD Mutante von *C. glutamicum*

[0035] Der Stamm *C. glutamicum* R127 (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) wurde mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin mutagenisiert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Dazu wurden 5 ml einer über Nacht angezogenen *C. glutamicum* Kultur mit 250 μ l N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (5 mg/ml Dimethylformamid) versetzt und 30 Minuten bei 30°C und 200 Upm inkubiert (Adelberg 1958, Journal of Bacteriology 76: 326). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit steriler NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Durch Replikaplattierung auf Minimalmediumplatten CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al. Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), wurden Mutanten isoliert, die nur bei Zugabe von L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin (je 0,1 g/l) wuchsen.

[0036] Die Enzymaktivität der Dihydroxsäuredehydratase wurde im Rohextrakt dieser Mutanten bestimmt. Dazu wurden die Klone in 60 ml LB-Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels 10 minütiger Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in den Enzymtest eingesetzt. Der Reaktionsansatz des Enzymtests enthielt 0,2 ml 0,25 M Tris/HCl, pH 8, 0,05 ml Rohextrakt, und 0,15 ml 65 mM alpha,β-Dihydroxy-β-methylvalerat. Die Testansätze wurden bei 30 °C inkubiert, nach 10, 20 und 30 Minuten 200 μ l Proben genommen und deren Ketomethylvaleratkonzentration mittels HPLC-Analytik bestimmt (Hara et al. 1985, Analytica Chimica Acta 172: 167-173). Wie Tabelle 1 zeigt, weist der Stamm R127/7 keine Dihydroxsäuredehydrataseaktivität auf, wogegen die Isomereduktase und Acetohydroxsäuresynthase Aktivitäten als weitere Enzyme der Synthese der verzweigtketten Aminosäuren noch vorhanden sind.

35 Tabelle 1

36 Spezifische Aktivitäten (μ mol/min und mg Protein) verschiedener Enzyme in <i>C. glutamicum</i> Stämmen			
37 Stamm	Dihydroxsäure dehydratase	38 Isomero reduktase	39 Acetohydroxsäure synthase
40 R127	0,003	0,05	0,07
R127/7	0,000	0,06	0,09

2. Klonierung des ilvD-Gens von *C. glutamicum*

[0037] Chromosomal DNA aus *C. glutamicum* R127 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A (Boehringer Mannheim) gespalten und durch Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) aufgetrennt. Die Fraktion mit dem Fragmentgrößenbereich von etwa 6-10 kb wurde zur Ligation mit dem Vektor pJC1 (Cremer et al., Molecular and General Genetics 220 (1990) 478-480) eingesetzt. Der Vektor pJC1 wurde hierzu mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurden mit 20 ng der genannten Fraktion der chromosomal DNA ligiert und damit die Mutante R127/7 durch Elektroporation (Haynes und Britz, FEMS Microbiology Letters 61 (1989) 329-334) transformiert. Die Transformanten wurden auf die Fähigkeit getestet auf CGXII Agarplatten ohne Zugabe der verzweigtketten Aminosäuren wachsen zu können. Von über 5000 getesteten Transformanten wuchsen nach Replikaplattierung und zweitägiger Inkubation bei 30°C 8 Klone auf Minimalmediumplatten. Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben durchgeführt. Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA ergaben, daß in allen 8 Klonen dasselbe Plasmid, im Folgendem pRV genannt, enthalten war. Das Plasmid trägt ein Insert von 4,3 kb und wurde durch Retransformation auf seine Fähigkeit die ilvD-Mutante R127/7 zu komplementieren getestet. Durch Subklonierung

wurde der für die Komplementation der Mutante R127/7 verantwortliche Bereich auf ein 2,9 kb Scal/Xhol-Fragment eingegrenzt.

3. Sequenzierung des ilvD-Gens

[0038] Die Nukleinsäuresequenz des 2,9 kb Scal/Xhol-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Dabei wurde der Auto-Read Sequencing kit verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Gelektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm Paket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als ID SEQ NO 4 wiedergegeben. Die Analyse ergab ein offenes Leseraster von 1836 Basenpaaren, das als ilvD-Gen identifiziert wurde und für ein Polypeptid von 612 Aminosäuren kodiert, das als SEQ ID NO 5 wiedergegeben ist.

15 Beispiel 3

Konstruktion einer ilvA Deletionsmutante von *C. glutamicum*

[0039] Der Einbau einer Deletion in das ilvA-Gen von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde mit dem bei Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994)) beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt. Zur Konstruktion des Inaktivierungsvektors pK19mobsacBΔilvA wurde zunächst aus dem auf einem EcoRI-Fragment im Vektor pBM21 (Möckel et al. 1994, Molecular Microbiology 13: 833-842) vorliegenden ilvA-Gen ein internes 241 bp BgIII-Fragment entfernt. Hierzu wurde der Vektor mit BgIII geschnitten und, nach Abtrennung des ilvA internen BgIII-Fragmentes mittels Agarosegelektrophorese, religiert. Anschließend wurde aus dem Vektor das unvollständige Gen als EcoRI-Fragment isoliert und in den mit EcoRI linearisierten Vektor pK19mobsacB (Schäfer 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der erhaltene Inaktivierungsvektor pK19mobsacBΔilvA wurde durch Transformation in den *E. coli* Stamm S 17-1 eingebracht (Hanahan 1983, Journal of Molecular Biology 166: 557-580) und per Konjugation nach *C. glutamicum* ATCC13032 transferiert (Schäfer et al. 1990, Journal of Bacteriology 172: 1663-1666). Es wurden Kanamycin-resistente Klone von *C. glutamicum* erhalten, bei denen der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf Saccharose-haltigem LB-Medium ((Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press)) mit 15 g/l Agar, 2% Glucose/ 10% Saccharose) ausplattiert und Kolonien erhalten, welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465). Durch Überimpfen auf Minimalmediumplatten (Medium CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 5595-5603)) mit und ohne 2 mM L-Isoleucin, bzw. mit und ohne 50 µg/ml Kanamycin wurden 36 Klone isoliert, welche durch die Excision des Vektors Kanamycin sensitiv und Isoleucin auxotroph waren und bei denen nun das unvollständige ilvA Gen (ΔilvA-Allel) im Genom vorlag. Einer dieser Klone wurde als Stamm ATCC13032ΔilvA bezeichnet und weiter verwendet.

40 Beispiel 4

Expression der Gene ilvBN, ilvC und ilvD in *C. glutamicum*

[0040] Die Gene der Acetohydroxsäuresynthase (ilvBN) und der Isomeroreduktase (ilvC) (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116 und Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) und der Dihydroxsäuredehydratase (ilvD) (Beispiel 2) wurden zur Expression in den Vektor pECM3 kloniert. Der Vektor pECM3 ist ein Derivat von pECM2 (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465), das durch Deletion des ca. 1 kbp langen BamHI/BgIII DNA-Fragmentes entstand, welches das Kanamycinresistenzgen trägt.

[0041] In dem Vektor pKK5 (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116) lagen die Gene ilvBNC bereits im Vektor pJC1 (Cremer et al. 1990, Molecular and General Genetics 220: 478-480) kloniert vor. Aus diesem wurde ein 5,7 kb XbaI-ilvBNC-Fragment isoliert und zusammen mit einem, das ilvD-Gen enthaltende, 3,1 kb-XbaI Fragment des Vektors pRV in den mit XbaI linearisierten Vektor pECM3 eingebracht. Der Ligationsansatz wurde hierbei in den *E. coli* Stamm DH5αmcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5αmcr/pECM3ilvBNC wurde das Plasmid pECM3ilvBNC (Abbildung 3) erhalten.

[0042] Mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Chloramphenicolresistenz wurde das Plasmid pECM3ilvBNC in den Stamm ATCC13032ΔilvA eingebracht und der Stamm ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNC erhalten. Weiterhin wurde mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycinresistenz das Plasmid pEKEx2panBC in den Stamm ATCC13032 und in den Stamm ATCC13032ΔilvA eingebracht und die Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und

ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC erhalten. In den Stamm ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD wurden mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycin und Chloramphenicol die Plasmide pEKEx2panBC und pEKEx2 eingebracht. Auf diese Weise entstanden die Stämme ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC.

5

Beispiel 5

Konstruktion einer Pantothensäure bedürftigen panC-Mutante von *C. glutamicum*

10 [0043] Es wurde mit Hilfe des Inaktivierungsvektors pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) eine *C. glutamicum* R127 panC Mutante erzeugt.
 [0044] Zur Konstruktion des panC-Inaktivierungsvektors wurde zunächst ein 168 bp großes, zentrales Fragment des panC-Gens (Nukleotid 265-432 des 837 bp umfassenden Gens) von *C. glutamicum* mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrize diente hier der Vektor pUR1 (s. Beispiel 6); als Primer wurden die beiden
 15 20mer Primer 1 und Primer 2 eingesetzt: Primer 1 5' GTTCGCACCCGATGTGGAGG 3', Primer 2 5' ATGCACGAT-CAGGGCGCACC 3'. Die PCR wurde nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde nach Zwischenkondierung in die SmaI Schnittstelle des Vektors pUC18, als EcoRI/SalI Fragment gerichtet in den Inaktivierungsvektor pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der so erhaltene Vektor pK18mob'panC' wurde
 20 zur Transformation des *E. coli*-Stammes S 17-1 benutzt und nachfolgend per Konjugation in *C. glutamicum* R127 eingebracht. Durch Selektion auf Kanamycinresistenz wurden so Klone von *C. glutamicum* R127 erhalten, bei denen der Integrationsvektor durch ein homologes Rekombinationsereignis ins panC-Gen integriert ist. Der so erhaltene Stamm R12YpanC::pK18mob'panC' ist zur D-Pantothenatbestimmung geeignet.

25

Beispiel 6

Quantitative Bestimmung von D-Pantothenat

30 [0045] Zur quantitativen Bestimmung von D-Pantothenat wurde die *C. glutamicum* panC Mutante R127panC::pK18mob'panC' konstruiert (siehe Beispiel 5), deren Wachstum direkt von der D-Pantothenat Konzentration des Mediums abhängig ist. Dieser Stamm ist Pantothensäure auxotroph und zeigt bei Supplementation mit β-Alanin und D-Pantoat kein Wachstum.
 [0046] Zur Bestimmung von Pantothenat mit diesem Indikatorstamm wurde CGXII-Medium (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) als Testmedium eingesetzt. Dazu wurden je 3 ml 4/3 fach konzentriertes CGXII-Medium in einem Inkubationsröhrlchen (Falcon 2057, Becton and Dickinson, New Jersey, USA) mit 1 ml Pantothensäure-haltiger, steriler Eich- oder Probelösung versetzt und mit dem Indikatorstamm inkuliert. Als Inkokulum wurden jeweils 60 µl einer Glyzerinkultur des Indikatorstammes eingesetzt. Nach 40 stündiger Inkubation bei 30°C wurde die Zelldichte (OD₆₀₀) (Novaspec 4049 Spectrophotometer, LKB Biochrom, Cambridge, GB) der Testansätze bestimmt und mittels einer Eichkurve die Pantothensäurekonzentration ermittelt. Der Stamm weist bis zu einer Konzentration von
 40 25 µg/l eine lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothenatkonzentration auf, bei einer optischen Dichte von 0,5 bis 10. Zur Herstellung der Glyzerinkultur des Indikatorstammes wurde dieser Stamm auf unsupplementiertem CGXII-Medium 24 Stunden inkubiert (Aushungerung an D-Pantothenat). 1050 µl der Kultur wurden anschließend mit 700 µl Glyzerin versetzt. Von dieser bei -70°C zwischengefrorenen Glyzerinkultur wurden 60 µl zu Bestimmung von D-Pantothenat, wie zuvor beschrieben benutzt. Als Referenz wurde Na-Pantothenat verwendet, das von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen wurde.
 45

Beispiel 7

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen

50 [0047] Zur Untersuchung ihrer Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032, ATCC13032/pEKEx2panBC, ATCC13032ΔilvA und ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ von 0,5 betrug. Das
 55 Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al., (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) beschriebenen Medium, enthielt aber zusätzlich 2 mM L-Isoleucin. Das von Keilhauer et al. beschriebene Medium CgXII ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Zusammensetzung des Mediums CGXII	
Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{Mg}_2\text{O}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin (pH7)	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	0,03 mg/L

[0048] Bei der Kultivierung der Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und Stammes ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC wurde das Medium nach 5 Stunden zusätzlich mit 1 mM Isopropylthio- β -D-galactosid versetzt. Nach 24 stündiger Kultivierung wurden Proben genommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde mit Hilfe des im Beispiel 6 beschriebenen Pantothenat-
tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

D-Pantothenatbildung in verschiedenen C. glutamicum Stämmen	
Stamm	D-Pantothenat (mg/l)
ATCC13032	0,01
ATCC13032/pEKEx2panBC	0,03
ATCC13032ΔilvA	0,06
ATCC13032ΔilvA/pEKEx2panBC	0,3

Beispiel 9

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen C. glutamicum Stämmen bei β -Alanin Zugabe

[0049] Zur Quantifizierung der Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium(Difco Laboratories, Detroit, USA) mit 25 mg/l Kanamycin und 3 mg/l Chloramphenicol für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert, zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ 0,5 betrug. Das Medium enthielt hierbei 2 mM L-Isoleucin, 25 mg/l Kanamycin, 3 mg/l Chloramphenicol und β -Alanin in

EP 1 006 189 A2

einer Endkonzentration von 20 mM. Nach 5 stündiger Kultivierung wurde dem Medium jeweils IPTG (Isopropylthio- β -D-galactosid) in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Nach 49 und 74 Stunden wurde eine Probe entnommen, die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde wie in Beispiel 6 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

5

Tabelle 4

D-Pantothenatakkumulation in verschiedenen Stämmen von <i>C. glutamicum</i>			
10	Stamm	D-Pantothenat [mg/l] nach einer Inkubationszeit von	
		49 Stunden	74 Stunden
15	ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2	80	100
	ATCC13032ΔilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC	920	980

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (D) BUNDESLAND: Hessen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-60311

10

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Leo-Brandt Strasse
- (C) ORT: Juelich
- (D) BUNDESLAND: Nordrhein-Westfalen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-52425

15

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur
fermentativen Herstellung von D-Pantothensaeure
unter Verwendung coryneformer Bakterien

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPA)

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 2164 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

35

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

40

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
- (B) STAMM: ATCC13032

45

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
 (B) LAGE: 351..1163
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 351
 /EC_number= 4.1.2.12
 /product=

"Ketopantoathydroxymethyltransferase"
 /gene= "panB"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
 (B) LAGE: 1166..2002
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 1166
 /EC_number= 6.3.2.1
 /product= "Pantothenatsynthetase"
 /gene= "panC"

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCTTCGGGGT ACCAATTCTT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGTACA TTCTCGGCCA	60
GATTCAAGCTT TTCGGTAAGG ACGAAACACT TTCACTTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA	120
AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATT TAGAACTCTC CGAGAAATGG ATTAGTTCA	180
CGAGGTCAGC AAACGCCCTT TGCAGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTCGTG AGATAGTAGG	240
TCTTGAGGTA AAAATTTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT	300
GAATCAAATC GGAATTATTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC	356
Met Pro	
1	
ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA	404
Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu	
5 10 15	
GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG	452
Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala	
20 25 30	
CTT TCG CGC CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT	500
Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val	
35 40 45 50	
GGT GAT TCC GCT GCC AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG	548
Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser	
55 60 65	
ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT	596
Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala	
70 75 80	
ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG	644
Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu	
85 90 95	
GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CGG GTC ATG CGT GAA	692
Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu	
100 105 110	
ACG GGT GCG CCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG	740

5

10

15

25

30

35

40

45

50

55

EP 1006189 A2

	Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile Ala Gln	115 120 125 130	
5	ACG ATT CGA CGC ATT GTT GAT GCT GGA ATT CCG GTT GTC GGC CAC ATC Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly His Ile	135 140 145	788
	GGG TAC ACC CCG CAG TCC GAG CAT TCC TTG GGC GGC CAC GTG GTT CAG Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val Val Gln	150 155 160	836
10	GGT CGT GGC GCG AGT TCT GGA AAG CTC ATC GCC GAT GCC CGC GCG TTG Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg Ala Leu	165 170 175	884
	GAG CAG GCG GGT GCG TTT GCG GTT GTG TTG GAG ATG GTT CCA GCA GAG Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro Ala Glu	180 185 190	932
15	GCA GCG CGC GAG GTT ACC GAG GAT CTT TCC ATC ACC ACT ATC GGA ATC Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile Gly Ile	195 200 205	980
20	GGT GCC GGC AAT GGC ACA GAT GGG CAG GTT TTG GTG TGG CAG GAT GCC Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln Asp Ala	215 220 225	1028
	TTC GGC CTC AAC CGC GGC AAG AAG CCA CGC TTC GTC CGC GAG TAC GCC Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu Tyr Ala	230 235	1076
25	240		
	ACC TTG GGC GAT TCC TTG CAC GAC GCC GCG CAG GCC TAC ATC GCC GAT Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile Ala Asp	245 250 255	1124
30	ATC CAC GCG GGT ACC TTC CCA GGC GAA GCG GAG TCC TTT TA ATG CAG Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe Met Gln	260 265 270 1	1171
	GTA GCA ACC ACA AAG CAG GCG CTT ATC GAC GCC CTC CTC CAC CAC AAA Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His His Lys	5 10 15	1219
35	TCC GTC GGG CTC GTC CCC ACC ATG GGT GCG CTA CAC AGC GGA CAC GCC Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly His Ala	20 25 30	1267
40	TCG TTG GTT AAA GCA GCA CGC GCT GAA AAC GAC ACT GTT GTA GCC AGT Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val Ala Ser	35 40 45 50	1315
	ATT TTT GTC AAT CCC CTG CAG TTT GAA GCA CTC GGT GAT TGC GAT GAT Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys Asp Asp	55 60 65	1363
45	TAC CGC AAC TAT CCC CGC CAA CTC GAC GCC GAT TTA GCA CTG CTT GAA Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu Glu	70 75 80	1411
	GAG GCA GGT GTG GAT ATT GTG TTC GCA CCC GAT GTG GAG GAA ATG TAC Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu Met Tyr	85 90 95	1459
50	CCC GGT GGC TTG CCA CTA GTG TGG GCG CGC ACC GGT TCC ATC GGA ACA Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile Gly Thr	100 105 110	1507

55

EP 1 006 189 A2

	AAA TTG GAG GGT GCC AGC AGG CCT GGC CAT TTC GAT GGT GTG GCT ACC Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val Ala Thr 115 120 125 130	1555
5	GTG GTG GCG AAG CTG TTC AAT TTG GTG CGC CCT GAT CGT GCA TAT TTT Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala Tyr Phe 135 140 145	1603
	GGA CAA AAA GAT GCT CAG CAG GTT GCG GTG ATT CGG CGA TTG GTT GCC Gly Gln Lys Asp Ala Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu Val Ala 150 155 160	1651
10	GAT CTA GAC ATT CCC GTG GAG ATT CGT CCC GTT CCG ATT ATT CGT GGC Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile Arg Gly 165 170 175	1699
	GCC GAT GGC TTA GCC GAA TCC AGC CGC AAT CAA CGT CTT TCT TCG GAT Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser Ala Asp 180 185 190	1747
15	CAG CGA GCG CAA GCT CTG GTG CTG CCG CAG GTG TTG AGT GGG TTG CAG Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly Leu Gln 195 200 205 210	1795
20	CGT CGA AAA GCA GCT GGT GAA GCG CTA GAT ATC CAA GGT GCG CGC GAC Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala Arg Asp 215 220 225	1843
	ACC TTG GCC AGC GCC GAC GGC GTG CGC TTG GAT CAC CTG GAA ATT GTC Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu Ile Val 230 235 240	1891
25	GAT CCA GCC ACC CTC GAA CCA TTA GAA ATC GAC GGC CTG CTC ACC CAA Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu Thr Gln 245 250 255	1939
	CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile 260 265 270	1987
30	GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC AGCACGCAGC TTTCGATAAC Asp Asn Ile Glu Leu 275	2042
	GCGTGCTCAG CTCAGTGTGTT TTAGGTGCGC GGTGCGGATC GGAACCGGGA GTTGGCCACT GCGGTGGCGT GGCCTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA CA	2102 2162 2164
40	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:	
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LAENGE: 271 Aminosaeuren (B) ART: Aminosaeure (D) TOPOLOGIE: linear	
45	(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:	
	Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe 1 5 10 15	
50	Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr 20 25 30	
	Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu	

55

EP 1 006 189 A2

	35	40	45	
5	Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr			
	50	55	60	
	Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr			
	65	70	75	80
10	Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr			
	85	90	95	
	Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met			
	100	105	110	
	Arg Glu Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile			
	115	120	125	
15	Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly			
	130	135	140	
	His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val			
	145	150	155	160
20	Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg			
	165	170	175	
	Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro			
	180	185	190	
25	Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile			
	195	200	205	
	Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln			
	210	215	220	
30	Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu			
	225	230	235	240
	Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile			
	245	250	255	
	Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe			
	260	265	270	
35	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:			
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:			
	(A) LAENGE: 279 Aminosaeuren			
	(B) ART: Aminosaeure			
40	(D) TOPOLOGIE: linear			
	(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein			
	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:			
	Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His			
	1	5	10	15
45	His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly			
	20	25	30	
	His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val			
	35	40	45	
50	Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys			
	50	55	60	
	Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu			

	65	70	75	80
5	Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu			
	85		90	95
	Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile			
	100	105		110
10	Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val			
	115	120	125	
	Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala			
	130	135	140	
	Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu			
	145	150	155	160
15	Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile			
	165	170	175	
	Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser			
	180	185	190	
20	Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly			
	195	200	205	
	Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala			
	210	215	220	
25	Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu			
	225	230	235	240
	Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu			
	245	250	255	
30	Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg			
	260	265	270	
	Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu			
	275			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

35	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
	(A) LAENGE: 2952 Basenpaare
	(B) ART: Nucleotid
	(C) STRANGFORM: Doppelstrang
	(D) TOPOLOGIE: linear
40	(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA
	(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
	(iv) ANTISENSE: NEIN
45	(vi) URSPRUNGSLICHE HERKUNFT:
	(A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
	(B) STAMM: ATCC13032
	(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: MUTANTE R127
50	(ix) MERKMALE:
	(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
	(B) LAGE: 290..2125
	(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 290
	/EC_number= 4.2.1.9
	/product= "Dihydroxysaeuredehydratase"
	/gene= "ilvD"

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

5	AGTACTTGG A GCGCCAAAAG GCACTGGGCA AGCCAGTTCA GTTGAACCTC GATGACGACA	60
	CCGATGGAA TACAACACAA ACAGAAAGCG TTGAATCCCAGAGACCGGA CAAGCCGCGT	120
	CTGAAACCTC ACATCGTGAT AACCCCTGCGT CACAGCACTA GAGTGTAATA AGCCGTCGA	180
10	ACCAAAGGTC CACACCTCTG CACGAGTAGA AGCTCACCCA AGTTTCAAA GTGCCGTTGA	240
	TTCTTGACAA CCACCCGCG CTCTTTAGAG CAGATTGAA AAGCGCATC ATG ATC Met Ile 280	295
15	CCA CTT CGT TCA AAA GTC ACC ACC GTC GGT CGC AAT GCA GCT GGC GCT Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala Gly Ala 285 290 295	343
	CGC GCC CTT TGG CGT GCC ACC GGC ACC AAG GAA AAT GAG TTC GGC AAG Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe Gly Lys 300 305 310	391
20	CCA ATT GTT GCC ATC GTA AAC TCC TAC ACC CAG TTC GTG CCC GGA CAC Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro Gly His 315 320 325	439
	GTT CAC CTT AAG AAC GTC GGC GAT ATT GTG GCA GAT GCA GTG CGC AAA Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val Arg Lys 330 335 340 345	487
25	GCC GGT GGC GTT CCA AAG GAA TTC AAC ACC ATC GTC GAT GAC GGC ATC Ala Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp Asp Gly Ile 350 355 360	535
	GCC ATG GGA CAC GGC GGC ATG CTG TAC TCC CTG CCA TCC CGT GAA ATC Ala Met Gly His Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser Arg Glu Ile 365 370 375	583
30	ATC GCC GAC TCC GTC GAA TAC ATG GTC AAC GCA CAC ACC GCC GAC GCC Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr Ala Asp Ala 380 385 390	631
35	ATG GTG TGT ATC TCC AAC TGT GAC AAG ATC ACC CCA GGC ATG CTC AAC Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly Met Leu Asn 395 400 405	679
	GCA GCA ATG CGC CTG AAC ATC CCA GTG GTC TTC GTT TCC GGT GGC CCA Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser Gly Gly Pro 410 415 420 425	727
40	ATG GAA GCT GGC AAG GCT GTC GTC GTT GAG CGC GTT GCA CAC GCA CCA Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Glu Arg Val Ala His Ala Pro 430 435 440	775
	ACC GAC CTC ATC ACC GCG ATC TCC GCA TCC GCA AGC GAT GCA GTC GAC Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp Ala Val Asp 445 450 455	823
45	GAC GCA GGC CTT GCA GCC GTT GAA CGA TCC GCA TGC CCA ACC TGT GGC Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr Cys Gly 460 465 470	871
	TCC TGC TCC GGT ATG TTC ACC GCG AAC TCC ATG AAC TGC CTC ACC GAA Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu Thr Glu 475 480 485	919
50	GCT CTG GGA CTT TCT CTC CCG GGC AAC GGC TCC ACT CTG GCA ACC CAC	967

EP 1 006 189 A2

	Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu Ala Thr His	
	490 495 500 505	
5	GCA GCA CGT CGC GCA CTG TTT GAA AAG GCC GGC GAA ACC GTC GTC GAA Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr Val Val Glu	1015
	510 515 520	
	CTG TGC CGC CGC TAC TAC GGT GAA GAA GAC GAA TCC GTT CTG CCA CGT Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val Leu Pro Arg	1063
	525 530 535	
10	GGC ATT GCC ACC AAG AAG GCA TTC GAA AAC GCA ATG GCA CTG GAT ATG Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala Leu Asp Met	1111
	540 545 550	
15	GCC ATG GGT GGA TCC ACC AAC ACC ATC CTC CAC ATC CTC GCA GCT GCC Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu Ala Ala Ala	1159
	555 560 565	
	CAG GAA GGC GAA GTT GAC TTC GAC CTC GCA GAC ATC GAC GAA CTG TCC Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp Glu Leu Ser	1207
	570 575 580 585	
20	AAA AAC GTC CCC TGC CTG TCC AAG GTT GCA CCA AAC TCC GAC TAC CAC Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser Asp Tyr His	1255
	590 595 600	
	ATG GAA GAC GTC CAC CGC GCC GGT CGC ATT CCA GCA CTG CTC GGC GAG Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Arg Ile Pro Ala Leu Leu Gly Glu	1303
	605 610 615	
25	CTC AAC CGC GGT GGC CTG CTG AAC AAG GAC GTC CAC TCC GTT CAC TCC Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser Val His Ser	1351
	620 625 630	
	AAC GAC CTT GAA GGT TGG TTG GAT GAC TGG GAT ATC CGC TCT GGC AAG Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg Ser Gly Lys	1399
30	635 640 645	
	ACC ACC GAA GTA GCA ACC GAA CTC TTC CAC GCA GCC CCA GGT GGC ATC Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro Gly Gly Ile	1447
	650 655 660 665	
35	CGC ACC ACC GAA GCA TTC TCC ACC GAG AAC CGC TGG GAC GAA CTC GAC Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp Glu Leu Asp	1495
	670 675 680	
	ACC GAC GCT GCC AAG GGC TGC ATC CGC GAC GTT GAA CAC GCC TAC ACC Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His Ala Tyr Thr	1543
	685 690 695	
40	GCC GAC GGC GGC CTG GTT CTT CGC GGC AAC ATC TCC CCT GAC GGC Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro Asp Gly	1591
	700 705 710	
	GCA GTG ATC AAG TCC GCA GGT ATC GAA GAA GAG CTG TGG AAC TTC ACC Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp Asn Phe Thr	1639
	715 720 725	
45	GGA CCA GCA CGA GTT GTC GAA AGC CAG GAA GAG GCA GTC TCT GTC ATC Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val Ser Val Ile	1687
	730 735 740 745	
50	CTG ACC AAG ACC ATC CAA GCT GGC GAA GTT CTG GTC GTC CGC TAC GAA Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg Tyr Glu	1735
	750 755 760	
	GGC CCA TCA GGT GGA CCA GGC ATG CAG GAA ATG CTT CAC CCA ACC GCA	1783

EP 1 006 189 A2

	Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His Pro Thr Ala	
	765 770 775	
5	TTC CTC AAG GGA TCC GGC CTG GGC AAG AAG TGT GCA CTG ATC ACC GAC Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu Ile Thr Asp	1831
	780 785 790	
	GGC CGT TTC TCC GGA GGT TCC TCA GGA CTG TCC ATC GGC CAC GTC TCC Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly His Val Ser	1879
	795 800 805	
10	CCA GAA GCA GCA CAC GGC GGA GTC ATT GGT CTG ATC GAA AAC GGC GAC Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu Asn Gly Asp	1927
	810 815 820 825	
15	ATC GTC TCC ATC GAC GTT CAC AAC CGC AAG CTC GAA GTT CAG GTC TCC Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val Gln Val Ser	1975
	830 835 840	
	GAC GAG GAA CTC CAG CGC CGC GAC GCT ATG AAC GCC TCC GAG AAG Asp Glu Leu Gln Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala Ser Glu Lys	2023
	845 850 855	
20	CCA TGG CAG CCA GTC AAC CGT AAC CGC GTT GTC ACC AAG GCA CTG CGC Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys Ala Leu Arg	2071
	860 865 870	
	GCA TAC GCA AAG ATG GCT ACC TCC GCT GAT AAG GGT GCA GTC CGT CAG Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val Arg Gln	2119
	875 880 885	
25	GTC GAC TAACCCTTTG TGAGTGTGTTG AGCACCGGTT CCCTACTTTG GGTTCCGGTG Val Asp	2175
	890	
	CTTTTCATG TCTTGGCTG TGTGGCGTG GTGGAGCTCC CGGTTGCAA TACTCACCAC	2235
30	AAGTTGCAGG ATTTCTGCTG GTTGTGGTGG ATTTTCCCGC TTTATAGCCC TATGCGTGCA	2295
	ACTTTCGGAC CGATTCCAAA GGGCAAAGCC CTGTTTGTGG TGGATCCTTG CCCTGGAAGC	2355
	TTTCAGGAAC CACAACCTACC CCACTGACCC CAAAGTGGAT AGGCCCTATT CTTCCGTTA	2415
35	AGCGCCTCAA ACACCTCTCC CCACACTTGA CCCATTAGGC AATTACGAAT CCTTAAACAG	2475
	CCTTCTACAG CACCATGCC CAAACCGAAC CCAGGCATGA AAAAGACCTT CACCAGGAGG	2535
	GTCTTTTCT AAAACTTTGG CTACCGGATT GGGTCACAC CCGCACCGAA CCACCACAGC	2595
	AGAACTGCCG CTGCGATGCC GATGACCACG AAGATCCACG AGCTCACCGAG TGGACGCTTT	2655
40	GCCCAACCTC GGCCAGAGTC AAGGGAAATC TTGCCGGGGC CGGTGAACCTG AAGTCCGACA	2715
	ACCACGATAG TGAGGATCAG TGCCAGCATC AATGGCTCAC TAAGTTCACCC CCAACCACCT	2775
	TCATGAGTGT TGACTTGGTG AAGGGTGGTA AAGGATGTGCG CCACCGTGGC TACCGCTGCT	2835
45	GCCACTGGGG TCATCAGACC AAGGAGCAGG AAGACACCAAG CCGCAAGTTTC AATAGATGGA	2895
	AGCAGGATCG CGAGGATTTG AGGCCACTGG TAACCAGCGA ACTCTGCCTC GACTCTA	2952

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 612 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear

EP 1 006 189 A2

(iii) ART DES MOLEKUELS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

5 Met Ile Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala
1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe
20 25 30

Gly Lys Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro
10 35 40 45

Gly His Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val
50 55 60

Arg Lys Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp Asp
15 65 70 75 80

Gly Ile Ala Met Gly His Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser Arg
85 90 95

Glu Ile Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr Ala
20 100 105 110

Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly Met
115 120 125

Leu Asn Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser Gly
25 130 135 140

Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Glu Arg Val Ala His
145 150 155 160

Ala Pro Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp Ala
165 170 175

Val Asp Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr
30 180 185 190

Cys Gly Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu
195 200 205

Thr Glu Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Asn Gly Ser Thr Leu Ala
35 210 215 220

Thr His Ala Ala Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Ala Gly Glu Thr Val
225 230 235 240

Val Glu Leu Cys Arg Arg Tyr Tyr Gly Glu Glu Asp Glu Ser Val Leu
40 245 250 255

Pro Arg Gly Ile Ala Thr Lys Lys Ala Phe Glu Asn Ala Met Ala Leu
260 265 270

Asp Met Ala Met Gly Gly Ser Thr Asn Thr Ile Leu His Ile Leu Ala
275 280 285

Ala Ala Gln Glu Gly Glu Val Asp Phe Asp Leu Ala Asp Ile Asp Glu
45 290 295 300

Leu Ser Lys Asn Val Pro Cys Leu Ser Lys Val Ala Pro Asn Ser Asp
305 310 315 320

Tyr His Met Glu Asp Val His Arg Ala Gly Arg Ile Pro Ala Leu Leu
50 325 330 335

Gly Glu Leu Asn Arg Gly Gly Leu Leu Asn Lys Asp Val His Ser Val

55

	340	345	350
5	His Ser Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg Ser 355	360	365
	Gly Lys Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro Gly 370	375	380
10	Gly Ile Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp Glu 385	390	395
	Leu Asp Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His Ala 405	410	415
15	Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro 420	425	430
	Asp Gly Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp Asn 435	440	445
20	Phe Thr Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val Ser 450	455	460
	Val Ile Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg 465	470	475
25	Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His Pro 485	490	495
	Thr Ala Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu Ile 500	505	510
30	Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly His 515	520	525
	Val Ser Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu Asn 530	535	540
35	Gly Asp Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val Gln 545	550	555
	Val Ser Asp Glu Glu Leu Gln Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala Ser 565	570	575
40	Glu Lys Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys Ala 580	585	590
	Leu Arg Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val 595	600	605
45	Arg Gln Val Asp 610		

50

Abbildungen

[0050] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

55

Abbildung 1:
Restriktionskartierung von pUR1 und Lage des sequenzierten Fragments.

Abbildung 2:
Restriktionskarte des Plasmids pEKEx2panBC.

Abbildung 3:
Restriktionskarte des Plasmids pECM3ilvBNCD.

Patentansprüche

1. In Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
 - b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls
 - c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.
2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1
mit
 - (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
 - (ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
 - (iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls.
 - (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in i).
3. Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2.
4. Pendelvektor (shuttle vector) pECM3ilvBNCD,
gekennzeichnet
- 35 durch die in der Abb. 3 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als E.coli DH5 α mcr/pECM3ilvBNCD unter der Bezeichnung DSM 12457.
5. Pendelvektor (shuttle vector) pEKEx2panBC,
gekennzeichnet
- 40 durch die in der Abb.2 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als E.coli DH5 α mcr/pEKEx2panBC unter der Bezeichnung DSM 12456.
- 45 6. Verfahren zur Herstellung von Pantothenäure,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in den Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* das panB- und panC-Gen und gegebenenfalls weitere für die entsprechenden Enzyme codierenden Nucleotidsequenzen verstärkt (überexprimiert) und diese Mikroorganismen zur Fermentation einsetzt.
- 50 7. Verfahren zur Herstellung gemäß Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zusätzlich das ilvD-Gen verstärkt (überexprimiert).
- 55 8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

daß man zusätzlich die Gene ilvBNCD verstärkt (überexprimiert).

9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

5 daß man zur Erzielung der Verstärkung die Kopienzahl der Gene bzw. Nucleotidsequenzen in den Mikroorganismen durch Transformation mit diesen Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren erhöht.

10 10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

daß man zur Erzielung der Verstärkung die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und Regulationsregion mutiert.

15 11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

daß man zur Erzielung der Verstärkung stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.

20 12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

25 daß man zur Erzielung der Verstärkung die Lebensdauer der mRNA, die von den oben genannten Sequenzen als Matrize abgelesen wird, verlängert und/oder den Abbau der (des) entsprechenden Enzymproteins(e) verhindert.

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,

30 daß man die Gene gemäß Anspruch 1 in Corynebacterien überexprimiert, die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.

14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,

35 daß man zur Erzielung der Überexpression das Kulturmedium und/oder die Fermentationsführung ändert.

15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,

40 daß man zumindest einen der Stoffwechselwege in den Mikroorganismen ausgeschaltet, die die Pantothenat-(Pantothensäure)-bildung verringern.

16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,

45 daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zu einem oder mehreren der Gene die übrigen Gene des Stoffwechselweges der Pantothensäurebildung, einzeln oder gemeinsam, überexprimiert.

50 17. Verfahren gemäß Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,

daß man im Stoffwechselweg das ilvA-Gen ausschaltet.

55 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,

daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt, die den Pendelvektor pECM3ilvBNCD ent-

halten.

19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,

5

daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* einsetzt, die den Pendelvektor pEKEx2panBC ent-
halten.

20. Verfahren zur Herstellung von Pantothenensäure durch Fermentation von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man

15 a) zumindest eines der Gene panB oder panC, bevorzugt panBC, gegebenenfalls in Kombination mit dem ilvD-
Gen, verstärkt (überexprimiert), und
b) die Pantothenensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert, und
c) die Pantothenensäure isoliert.

21. Verfahren gemäß den Ansprüchen 19 und 20,
dadurch gekennzeichnet,

20

daß man während der Fermentation eine Vorstufe der Pantothenensäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe
Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoat oder Pantoat.

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

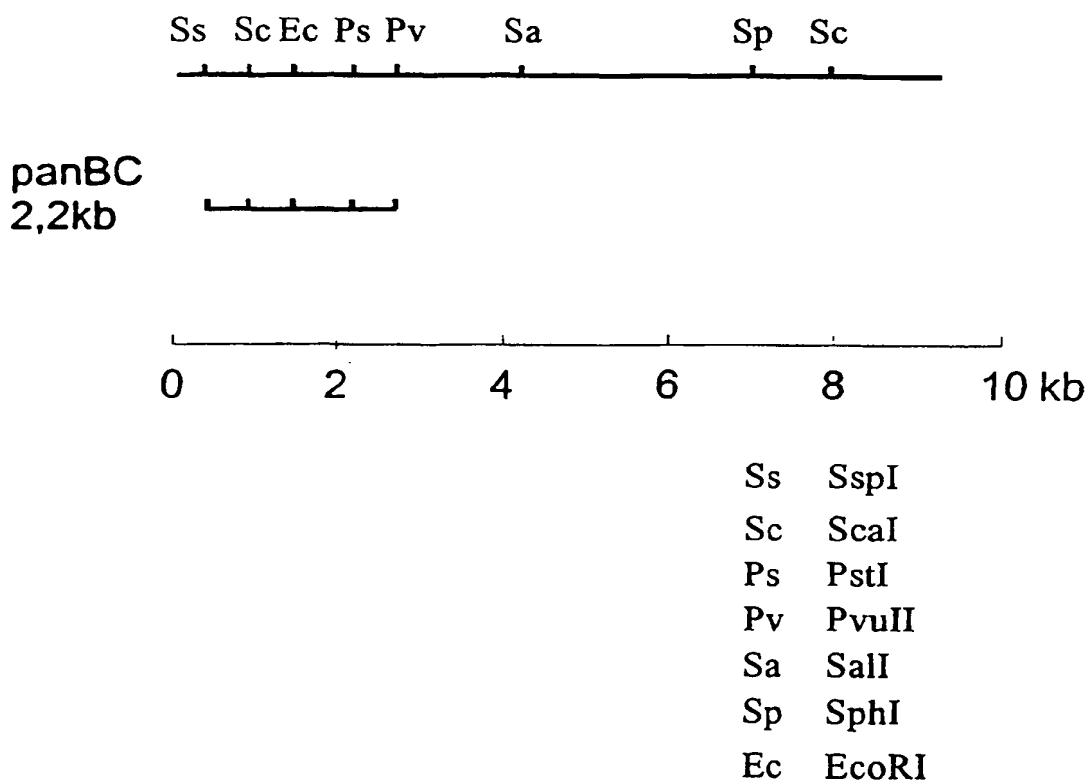


Abbildung 2

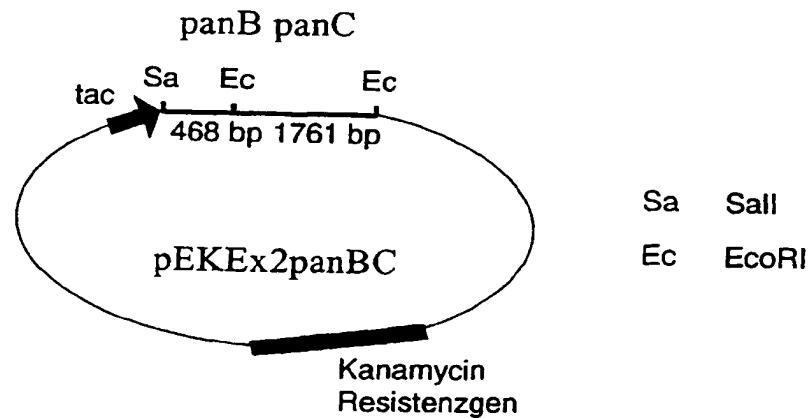


Abbildung 3

